



ごあんない

・ 今月の定期講習会

赤木 征宏

定期講習会報告

・ 『糸状菌の検査法』

浅田 薫

はくとおやじの知識箱

・ 細菌芽胞について (最近の知見も交えて)
・ 肝膿瘍

仁木 誠

赤木 征宏

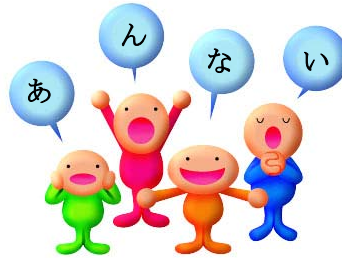
バイキン Quiz

中家 清隆

(敬称は略させていただきました)

今月の定期講習会は

2月23日(火) 大阪医療技術学園専門学校で開催いたします。



今月の定期講習会

テーマ：『嫌気性菌の培養同定検査（仮）』

講師：極東製薬工業（株） 営業学部微生物グループ
豊田耕一

日時：平成22年2月23日（火） 18:30～20:00

場所：大阪医療技術学園専門学校
（〒530-0044 大阪市北区東天満 2-1-30）

評価点：専門－20点（会員証をお持ちください）

参加費：会員500円、非会員3000円

連絡先：（財）大阪府警察協会大阪警察病院 赤木 征宏

e-mail：akg@oph.gr.jp



皆様の施設ではどのように嫌気性菌の培養同定検査を進めてますでしょうか？使用する培地も、同定キットも施設によって当然違うでしょうし、本当にこの同定菌名で良いのだろうかと思うこともしばしばあるのではないのでしょうか？

今回は極東製薬の豊田耕一先生に、嫌気性菌の培養同定において知っておかなければならないこと、同定のポイントとなる性状などについてご講演を頂く予定です。皆様奮ってご参加ください。

定期講習会報告

11月定期講習会報告

糸状菌の検査法

北野病院 浅田 薫

去る2009年11月24日、大阪医療技術学園校舎にて、当部門世話人でもある大阪医療センターの佐子 肇先生に糸状菌全般の検査法について、勉強会を開いていただきましたので報告します。

勉強会では、90分と短い時間の中で、300枚超のスライドを用い、講義していただきました。普段馴染みのあるものから、聞き覚えのないものまで、多種多様の菌種に関して、同定検査法・感受性パターンについてお話していただきました。

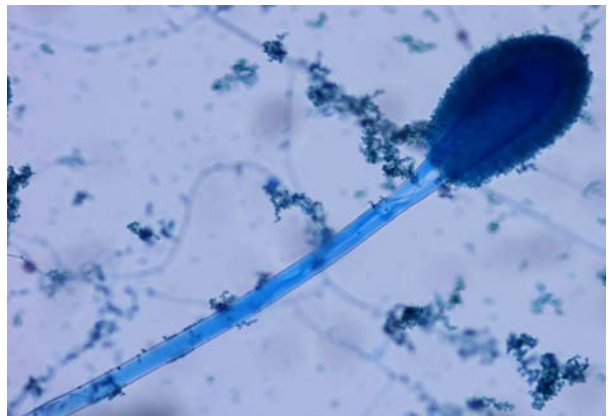
報告は、普段目にしない珍しい菌種をピックアップし、ほんの一部紹介したいと思います。

Aspergillus 属

我々が、日常検査で最も頻繁に出会う真菌の一つです。メジャーな菌種については、紹介を省略させていただきます。

【*Aspergillus clavatus* group】

- ・ 一般的には汚染菌と考えられている。
- ・ 培地上の発育は比較的早い。
- ・ 発育集落の表面はフェルト状で、青緑色を呈する（帯灰青緑色の密な短毛状の集落）。
- ・ 分生子柄は平滑で長い。
- ・ フィアライドは単列性、特徴的で巨大な棍棒状の頂囊（約 $200 \times 40 \mu\text{m}$ ）に密に群生する。



分生子頭が大きな棍棒状である

黒色真菌

含まれる菌種として、*Fonsecaea*, *Exophiala*, *Phialophora*, *Cladsporium*, *Cladphialophora*, *Hortaea*など。

培地集落の色調が、メラニン色素による黒褐色ないし、それに近い色調を示す菌群を黒色真菌と呼ぶ。

感染症として、クロモミコーシス，内臓病変，黒癬など。

病原性黒色真菌に起因する疾患

| 感染部位 | 病型 | 病原菌種 |
|--------------------------------|--------|---|
| 深部皮膚 (皮膚, 皮下組織, 深部臓器) | CM→CBM | <i>F. pedorosoii</i> , <i>P. verrucosa</i> <i>E. dermatitidis</i> , <i>C. carionii</i> |
| | PHM | <i>E. jeanselmei</i> , <i>E. dermatitidis</i> (<i>A. alternata</i>) |
| | 菌種 | <i>E. jeanselmei</i> |
| 表在性 (皮膚,毛髪) | 黒癬 | <i>Hortaea werneckii</i> |

CM : chromomycosis CBM : chromoblastomycosis PHM : phaeohyphomycosis

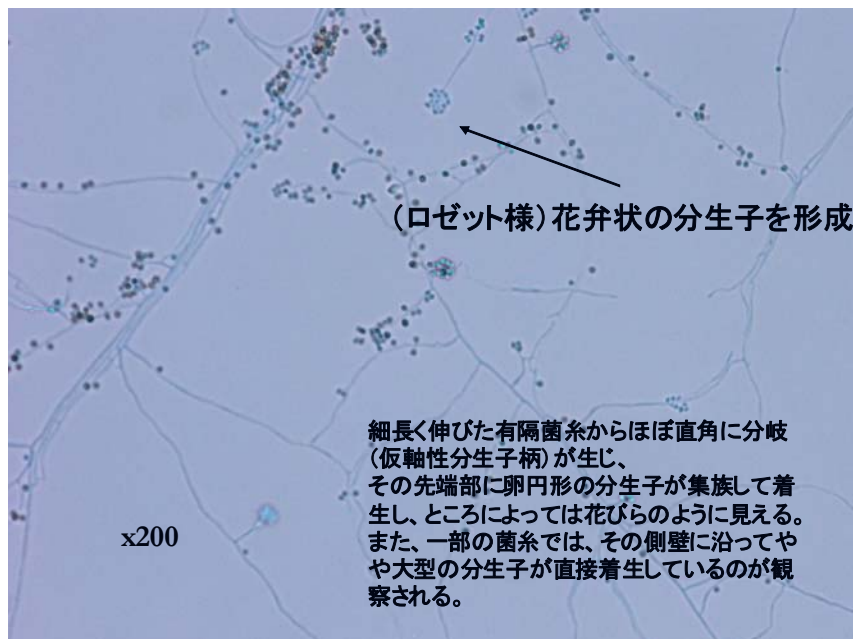
【*Sporothrix schenckii*】

- ・ 本菌は、Sporothrichosis の原因菌であり、主に皮膚やリンパ管が侵される。世界中の国々において、最も重要な深在性皮膚真菌症である。
- ・ 温度依存性の二形性真菌である。
- ・ 成人での好発部位は、顔面，上肢である。
- ・ 小児での好発部位は、ほぼ顔面に限られる。
- ・ 感染後、皮下に肉芽腫病変を作り、リンパ管や血行性に転移し、病巣を作る。
- ・ 集落の生育はやや遅く、表面は湿性膜様あるいは粉状、皺がありなめし皮状の外観を呈する。
- ・ はじめは灰白色であるが、次第に淡灰褐色から黒色に変化することが多い。
- ・ 菌糸形コロニーはかなりの硬さを持つ。
- ・ 黒色真菌と見誤られることがあるので、注意が必要である。
- ・ 1%デキストロース加ブレインハートインフュージョン寒天培地に 35℃で培養すると、白色から灰白色の酵母様集落を形成する。→炭酸ガス培養下では、酵母形発育はさらに良好である。

——顕微鏡的所見——

27℃の培養では、菌糸は無色で細かく、隔壁を有し分岐する。分生子柄は菌糸様、隔壁を有し先端は鶏のトサカ状に膨れ、仮軸状を呈する。

分生子は1細胞で2種類ある。1つは垂球形、卵円形あるいは棍棒状で、分生子柄先端の小歯上に単生し、花弁状に見えるものと、隔壁厚く分生子柄の側壁に沿って並んで生じる、暗色、大型の分生子がある。



このほかにも、数え切れないほどの多種にわたる真菌についてお話していただきました。ぜひ、ご紹介したいのですが、写真によって説明されているものも多いので、ほんの一部とさせていただきます。

真菌検査は、培養・同定を行うには、根気と時間と経験が必要になってきます。近年は、遺伝子による診断もよく知られるようになってきましたが、一般の検査室では、コスト面で大きな壁があります。

個人的には、どちらも大切な方法と考えていますが、同定の技術を習得するには、一朝一夕とはいきません。どんな仕事でも同じことですが、経験を積むことが“次”への方向づけへ確信を持つて行うことができるはずです。

真菌は思うように育ってくれないことも多く、“ワケワカラーン”と投げ出してしまいたくなることもあるかもしれませんが、慣れていない方は、まず丁寧にスライドカルチャーを作り、標本観察のタイミングを見極めるところから始めていただきたいと思います。私自身も、真菌に関しては、勉強不足の部分が沢山ありますので、日々勉強していきたいと思っています。皆さんも、勉強会を通して、一緒に学んでいきましょう。

ばくとあやしの知識箱

細菌芽胞について（最近の知見も交えて）

大阪市立大学医学部附属病院 仁木 誠

【はじめに】

芽胞 spore を形成する細菌は、熱や乾燥、消毒薬に対し強い抵抗性を持つことで環境中に長く生息することが可能であり、そのため、以前より食中毒やリネン類の汚染による菌血症などの起原菌として問題視されてきました。芽胞形成菌に起因する感染症を防ぐためにも、また芽胞に対し有効な抗菌薬を開発するためにも、芽胞形成に関する調査・研究は非常に重要であると言えます。以下に細菌芽胞の一般的な特徴と、最近報告された抗酸菌の芽胞に関する研究論文を紹介します。

【芽胞とは】

芽胞とは、一部の細菌が形成する極めて耐久性の高い細胞構造であり、芽胞殻、皮層、芯部からなります。芯部には、DNA やリボソーム、酵素、低分子化合物などが含まれていて、半結晶状態になっています。芽胞を形成する細菌は限られており、芽胞形成菌あるいは有芽胞菌として、細菌を分類する上での一つの指標となっています。芽胞形成菌の中には *Amphibacillus* 属、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、*Sporosarcina* 属などが存在しますが、このうち病原性菌として重要なものは *Bacillus* 属と *Clostridium* 属です。

芽胞形成能を有する細菌は、栄養や温度、乾燥など周囲の環境がその細菌の生育に不利な状況に置かれたり、毒性を示す化合物と接触したりすると、細菌細胞内に芽胞を形成します。芽胞は極めて高い耐久性を持っており、さらに環境が悪化して通常の細菌が死滅する状況に陥っても生存することが可能です。しかし、芽胞の状態では細菌は新たに分裂することはできず、その代謝も限られています。このため芽胞は耐久型、休眠型と呼ばれることがあります。生き残った芽胞が再度増殖に適した環境に置かれると、芽胞は発芽して、通常の増殖・代謝能を有する菌体が作られます。この通常の菌体を芽胞と対比して、栄養型、増殖型と呼びます。

【芽胞の抵抗性】

水分の少ない濃厚な原形質と核を厚い殻で覆っており、消毒薬のような化学物質や乾燥熱、紫外線、放射線照射に対して強い抵抗性を示します。一般的な消毒薬では次亜塩素酸ナトリウムがやや有効な程度で、塩化ベンザルコニウムやアルコール類などでは不活化することが非常に困難であり、確実に不活化するには高水準消毒薬であるグルタラールを長時間接触させる必要があります。また、芽胞は通常の細菌と比べて極めて高温に強く、100℃の煮沸にも耐えることができます。芽胞を高温で完全に不活化するにはオートクレーブ処理や乾熱滅菌を行うことが必要となります。

【芽胞の構造及び成分】

完成した芽胞は、菌体がいくつかの厚い層で包まれた形をしており、外側から芽胞殻 spore coat（外芽胞殻、内芽胞殻）、皮層 cortex、芯部 core となっています。また、芽胞ではその水分の 60～70%は結合水の形になっており、自由水を持たない脱水状態となっています。芽胞の特徴的な成分として芯部には 5～12%のジピコリン酸が存在しています。

【芽胞形成サイクル】

芽胞形成

炭素や窒素源が欠乏し、栄養条件が整っていない条件下において、対数増殖期が終了した時期より芽胞の形成が始まります。芽胞形成には、増殖期に働く遺伝子の不活化と同時に、芽胞形成遺伝子の活性化が起こります。それに伴って、この時期に特有の遺伝子産物として新たな酵素や代謝物が作られ、芯部（核、細胞質）ができ、皮層ができると同時に、染色体を凝集してリボゾームとタンパクの一部を濃縮し硬い被膜で覆い包み、呼吸などの代謝はほとんど行わず生物活性をほぼ完全に休止させます。培養が古くなると母細胞が崩壊し、残された芽胞は遊離し完成された芽胞となります。

発芽

グルコースやアラニンのような発芽剤と接触したり、酸化などの要因によって芽胞殻に損傷が加えられたりすると、発芽の活性化が起こり、芽胞殻変性後、芽胞の融解、水分の取り込みなどの芽胞変性をへて細胞質から新たな栄養細胞が出現します。栄養条件などの周囲の環境が整うと再び増殖を開始します。

【芽胞を形成する代表的な細菌】

- ・ *Bacillus* 属 (好気性有芽胞グラム陽性桿菌)

Bacillus anthracis

Bacillus cereus

Bacillus subtilis

- ・ *Clostridium* 属 (嫌気性有芽胞グラム陽性桿菌)

Clostridium tetani

Clostridium botulinum

Clostridium perfringens

Clostridium difficile

【芽胞の検出】

芽胞は屈折性の強い物質であり、位相差顕微鏡で見ると、芽胞だけが強く光って見えます。芽胞は光を通さず、染色されにくい性質を有し、グラム染色では抜け像として観察されます。芽胞染色を行うことにより菌体と染めわけることができます。

Wirtzの芽胞染色法

1. 被験菌を塗抹、乾燥、火炎固定
2. 5%マラカイトグリーン液で5分程度加温染色した後、流水で30秒間水洗
3. 0.5%サフランイン液で30秒間染色し、水洗、乾燥
4. 鏡検 (芽胞：緑色、菌体：赤色)



以上のように、芽胞形成能を有する細菌は発育環境が悪化すると芽胞を形成し、環境が改善するまで休止状態となります(休眠型)。このことは宿主生体内に何十年も休眠状態で潜伏感染をする結核菌のライフサイクルを連想させます。休眠状態の結核菌も通常とは異なる代謝状態にあつて増殖せず、一般的な抗結核薬に対し抵抗性を示します。結核菌の休眠に芽胞が関与しているのか、そもそも芽胞を有するのか、以下に結核菌(抗酸菌)の芽胞について最近発表された研究論文を紹介します。

1. Sporulation in mycobacteria

(Ghosh et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA*)

抗酸菌は長時間病気を起こさずに宿主内に潜伏することが知られている。in vitro では定常期の菌体がこの休眠状態の菌にもっとも近い状態であるということから、結核菌と同じ *Mycobacterium* 属の *M. marinum* を用いて 増殖期から定常期にかけての菌の変化 を観察することにした。

結果

- ・顕微鏡的観察
 - 定常期において芽胞(菌体内芽胞 endospore)と推測される像が観察された
- ・電子顕微鏡的観察
 - 定常期において芽胞が認められた
- ・芽胞染色
 - 定常期において緑色の芽胞が見られた
 - ⇒電子顕微鏡観察像や芽胞染色像は過去に *Bacillus* の芽胞として報告されたものと酷似
- ・耐熱性
 - 定常期では 65°C10 分間の加熱に抵抗性を示した
- ・ジピコリン酸
 - 芽胞に特徴的な成分であるジピコリン酸は増殖期では存在しなかったが、定常期では存在が証明された
- ・芽胞形成関連遺伝子のホモログ検索
 - 抗酸菌ゲノムにおいて種々のホモログが認められ、芽胞形成量と mRNA 量は正相関を示した
- ・BCG でも *M. marinum* と同様に芽胞の形成が認められた

以上、この論文により抗酸菌も *Bacillus* 属の芽胞とよく似た芽胞を形成するということが証明された。

しかし、この報告に対し他の研究グループでは以下のように疑問視している。

2. Do mycobacteria produce endospores?

(Traag et al. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA*)

以前より、GC 含量の少ないグラム陽性菌にのみ認められていた芽胞（菌体内芽胞）が、GC 含量の多い *M. marinum* や BCG においても存在するという報告（論文 1）が最近なされた。この報告が真実であれば、結核菌の潜伏感染を説明し得る一助となることから、医学的に非常に重要な発見であると言える。今回、我々も *Bacillus* 属、*Clostridium* 属とは系統的にも遠く離れた位置にある抗酸菌について芽胞の有無を調べてみた。

結果

- ・芽胞形成関連遺伝子のホモログ検索
 - 抗酸菌ゲノムにおいて芽胞形成に関連するホモログは認められなかった
- ・電子顕微鏡的観察
 - 論文 1 で定常期に認められた芽胞は *B. subtilis* の芽胞と酷似している
 - ⇒以上のことから考えると、芽胞形成に関連するホモログを持たない *M. marinum* が、系統的に遠く離れた位置にある *B. subtilis* の芽胞と非常によく似た芽胞を形成するというのは考えにくい（実際に *Bacillus* 属の中でも芽胞の構造は種ごとにより全く異なる）。
- ・顕微鏡的観察
 - 定常期に入っても芽胞は認められなかった
- ・耐熱性
 - 論文 1 と同様の方法で熱抵抗性を調べたところ、定常期の菌においても抵抗性は認められず完全に死滅した。
 - ⇒この耐熱性実験の結果は *M. bovis* が熱感受性（代表的なものではミルクの低温殺菌 pasteurization）であることより利にかなっていると考え

とりあえず、論文 2 では論文 1 と同様の方法で実験を行ったが、芽胞の形成は認められなかったというのが Traag らの主張のようです。実は、ロベルト・コッホの時代から、抗酸菌が芽胞を形成するという報告がいくつもなされてきておりましたが、多くの場合、芽胞と思われていたものが実は中性脂肪体 neutral lipid body であつたり、または他の

菌のコンタミネーションであったというのが結末でした。論文 2 が正しければ、論文 1 のデータはほとんど全て否定されるという結果、つまり、論文 1 では芽胞形成を証明できなかったということになります。だからと言って抗酸菌が芽胞を形成しないということの証明にはなりません。今後、更なる研究で抗酸菌芽胞の有無がはっきりするのを楽しみにしましょう。

【引用及び参考文献】

- ・ Ghosh J, et al. (2009) Sporulation in mycobacteria.
Proc Natl Acad Sci USA 106:10781-10786.
- ・ Traag BA, et al. (2010) Do mycobacteria produce endospores?
Proc Natl Acad Sci USA 107:878-881

ばくとあやしの知識箱

『肝膿瘍』

大阪警察病院附属臨床検査センター
赤木 征宏

【肝膿瘍とは・・・】

肝膿瘍とは、肝臓内に化膿性炎症をおこし限局的に膿がたまる疾患である。病原体により細菌性肝膿瘍とアメーバ性肝膿瘍とに分けられる。

【発生機序】

肝臓への化膿性感染の伝播は多数の経路で起こりうる。細菌性肝膿瘍の原因として胆道系感染症が最も一般的で、続いて虫垂炎、憩室炎などの炎症性腸疾患に関連するものがあげられる。すなわち、

- ①総胆管結石、膵胆道系悪性腫瘍などに伴って腸内細菌が胆汁の生理的な流れとは逆行して胆道に感染し、胆管炎に引き続き肝膿瘍を発症する。
- ②虫垂炎、憩室炎、クローン病、潰瘍性大腸炎などの腹腔内感染症に続発し、門脈内菌血症をへて肝膿瘍を形成する。

③急性胆嚢炎の波及、大腸癌の肝浸潤など、周囲臓器の炎症が直接的に肝臓に波及し肝膿瘍を形成する。

④外傷による肝損傷部に感染を起こし肝膿瘍を形成する。

⑤切除不能の膵胆道系悪性主要や肝癌に対する治療後に発症する場合。

などがある。

アメーバ性肝膿瘍は、経口感染した赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) が、大腸病から門脈を介して肝臓に至り、肝臓内で膿瘍を形成する。海外渡航者に多く見られ、最近では男性同姓愛者での感染の増加がみられる。

しかし、肝膿瘍症例の4分の1程度で原因を確定することが出来ない場合がある事も忘れてはならない。

【臨床症状】

発熱、全身倦怠感、上腹部痛、右季肋部痛などの炎症症状と、黄疸など肝膿瘍の成因に起因する症状が現れる。アメーバ性肝膿瘍では、前述の症状に加え、血性下痢が認められる。

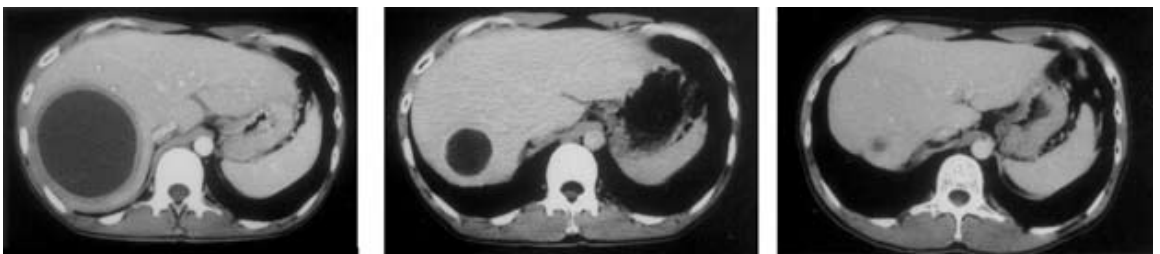
【診断・検査】

血液検査：白血球の増多（アメーバ性肝膿瘍を除き未成熟な好中球の増多）、
CRPの高値、アルカリフォスファターゼおよび胆道系酵素の上昇

超音波・CT・MRI：膿瘍の存在の証明、大きさ、数、周囲臓器への影響

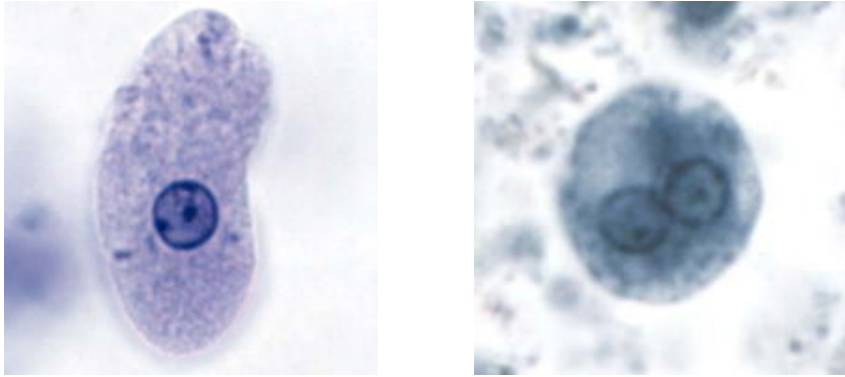
血清抗体価：アメーバ性肝膿瘍で赤痢アメーバ抗体価の陽性率は95%

経皮ドレナージ：ドレナージ膿汁検体からのアメーバの証明



▲赤痢アメーバ性肝膿瘍の治療によるCT像の変化

IDWR（感染症発生動向調査週報）ホームページより抜粋



▲赤痢アメーバの栄養型（左）とシスト型（右）

【検出菌】

およそ7割は複数菌腫による感染である。肝膿瘍からの検出菌は、原発部位を反映しており、すなわち、大腸菌、クレブジエラ、シュードモナス、腸球菌、バクテロイデス、フゾバクテリウム、ペプトストレプトコッカスなどが多く見られる。カンジダも肝臓を侵襲し、カンジダ性の膿瘍は化学療法による好中球減少の白血病患者などで見られる。アメーバ性肝膿瘍は、アメーバ性腸炎の3～9%に合併する。

【治療】

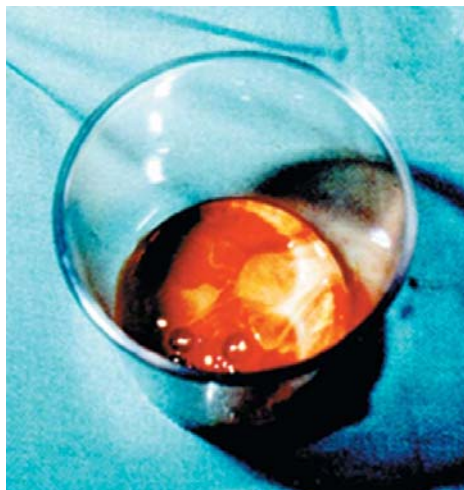
①経皮ドレナージ

②抗菌薬投与：細菌性の場合は抗域スペクトラムな抗菌薬（第3世代セフェム系薬、カルバペネム系薬、キノロン系薬、抗緑膿菌アミノグリコシド、 β ラクタマーゼ阻害剤との合剤ペニシリン系薬など）、アメーバ性の場合はメトロニダゾール。初期治療にはこれらを併用する。

③開腹ドレナージ・膿瘍切除：胆道閉塞やエキノコッカス以外の多房性膿瘍、経皮ドレナージや抗菌薬での治療効果が得られない場合、緊急時等

【アメーバ性肝膿瘍検体の検査法】

- ・ぬるま湯を入れた容器になどで保温して検査室に運ぶ。
- ・死滅すると速やかに融解するので、新鮮な標本を出来るだけ早く観察する。
- ・アンチョビソース、またはチョコレート様と形容される概観を呈する。
- ・栄養体が検出されるので、速やかにスライドグラスに採り、カバーガラスをし、無染色で検鏡する。
- ・残った検体は温度が下がらないようにフラン器などで検査が終わるまで保管する。
- ・鏡検は200～400倍で行い、運動性のある原虫を探す。
- ・標本の温度が下がってきたらシャーレ等で湿室をつくり、フラン器にしばらく戻す。
- ・検体採取の場所によっては、アメーバが少ない場合もあるので、標本は数枚作成し、それぞれの温度を保ちながら鏡検する。
- ・グラム染色も忘れずに実施する。アメーバ性の場合は、無臭でグラム染色でも殆ど菌を認めないことが多い。
- ・運動性のある原虫を認めたら、コーン染色等を行う。



<参考>

- ・g o oヘルスケア
- ・I D W R
- ・感染症診療スタンダードマニュアル



大阪市立大学医学部附属病院

中家 清隆

【問題】

新型インフルエンザの流行もようやく下火になってきた今日この頃。今回は、過去に起こったインフルエンザの大流行を正しく組み合わせてください。



- (1) ソ連風邪
- (2) 香港風邪
- (3) アジア風邪
- (4) スペイン風邪

| | A | B | C | D |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 発生時期 | 1918～1919 | 1957～1958 | 1968～1969 | 1977～1978 |
| 型 | H1N1 | H2N2 | H3N2 | H1N1 |
| 毒性 | 弱毒? 強毒? | 弱毒 | 弱毒 | 弱毒 |
| 死亡者数 | 5000 万人～ | 100 万人～ | 50 万人～ | 10 万人(?) |

死亡者数は文献により異なりますのでおおよその数値です。



バイキンQuizの解答

- 1 (D)
- 2 (C)
- 3 (B)
- 4 (A)

編集後記

皆さんの家はもう地デジ化されていますか？私の家はまだアナログです・・・。
「液晶テレビか？プラズマか？」などと思いつつ「まだ完全移行までしばらくあるし…」
と思っていたら、今度は3DTVの話があるではないですか（汗）。本格的に家庭でも3
Dの時代がやってくるのでしょうか。3Dと言えば先日、自施設の勉強会で3Dエコー
（実際には時間軸も合わせて4Dだそうです）の画像を見る期会がありました。産婦
人科などで採用されている施設も多いようですが、描かれる画像の鮮明差に驚きました。
しかし、それとともに明瞭な出生前診断がすぐ近くにまできたようで不安を感じました
少し前まで、一般の人が意識しなければ知りえなかった検査、その是非が問題視される
検査が、機械の老朽化により入れ替えただけの新しい機械で、いとも簡単に「分かって
当たり前」と知らされる違和感。私もまだまだアナログなのかな・・・

赤木 征宏 2010.2.8

【白金耳】 Vol.31. No.1. 2010.(平成22年2月号)

発行日：平成22年2月10日発行

発行：大阪府臨床検査技師会 学術部 微生物検査部門

表紙：井邊 幸子

発行者・編集：赤木 征宏（財団法人 大阪警察病院）

〒543-0035 大阪市天王寺区北山町10-31

TEL: 06-6771-6051 e-mail: akg@oph.gr.jp

許可なく転載および複写はご遠慮下さい